



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
QMC5510 – ESTÁGIO SUPERVISIONADO

**IMPREGNAÇÃO DO CORANTE NATURAL ANTOCIANINA EM
MATRIZ POLIMÉRICA DE QUITOSANA E QUITOSANA/ ALGINATO
E ESTUDOS DE LIBERAÇÃO**

Acadêmica: Karen Leidens
Orientador: Prof^a. Dra. Tereza Cristina Rozone de Souza

Florianópolis, junho de 2005.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
QMC5510 – ESTÁGIO SUPERVISIONADO

**IMPREGNAÇÃO DO CORANTE NATURAL ANTOCIANINA EM
MATRIZ POLIMÉRICA DE QUITOSANA E QUITOSANA/ ALGINATO
E ESTUDOS DE LIBERAÇÃO**

Karen Leidens

Relatório apresentado ao Curso de Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, para a obtenção da aprovação na disciplina QMC5510 – Estágio Supervisionado sob orientação da Prof^a. Dra. Tereza Cristina Rozzone de Souza.

Florianópolis, junho de 2005.

“Todos têm um propósito de vida, um dom singular ou um talento único para dar aos outros. E quando misturamos esse talento singular com benefícios aos outros, experimentamos o êxtase da exultação de nosso próprio espírito”

(Deepak Chopra)

AGRADECIMENTO

À minha família, minha mãe e meu irmão Tiago pelo constante apoio, carinho e amor em especial ao meu marido Gilmar pela compreensão nos momentos em que não pude estar presente.

À professora Dra. Tereza Cristina Rozone de Souza pela orientação prestada durante todo desenvolvimento deste trabalho.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

As minhas amigas: Elisangela, Ledilege, Fernanda, Silvia e Kerstin pela sincera amizade e apoio fundamental na realização deste trabalho, jamais esquecerei vocês.

Aos colegas do grupo Quitech, pelo apoio e colaboração em algumas etapas deste trabalho, em especial, ao Alexandre e a Bethânia.

Aos colegas e amigos Annelise, Rosely e Rafael pelo apoio e amizade, e pelas incansáveis vezes em que me auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos colegas do curso de Química da UFSC, pela amizade e apoio, em especial, ao Maikon, Lourenço, Lidiane, Ricardo.

A Deus por sua presença nos pequenos e grandes maravilhosos momentos da minha vida, Muito obrigada!

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	5
	LISTA DE TABELAS	7
	LISTA DE ABREVIATURAS	8
	RESUMO	9
	JUSTIFICATIVA	10
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
1.1	Corante Natural Antocianina	12
1.2	Quitina e Quitosana	15
1.3	Alginato de Sódio	17
1.4	Microencapsulação	19
1.5	Liberação Controlada	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo Geral	22
2.2	Objetivos Específicos	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	Materiais	23
3.2	Métodos	23
3.2.1	Determinação de Grau de Desacetilação da Quitosana (%GD)	23
3.2.2	Preparação das Microesferas de Quitosana	24
3.2.3	Preparação das Microesferas de Quitosana/ Alginato	24
3.2.4	Impregnação do Corante em Microesferas de Quitosana e Quitosana/ Alginato	25
3.2.5	Espectroscopia no Infravermelho (IV)	25
3.2.6	Morfologia das Microesferas	25
3.2.7	Análises Termogravimétricas (TGA)	26
3.2.8	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	26
3.2.9	Determinação da Quantidade de Corante Impregnado	27
3.2.10	Estudos de Liberação	27

3.2.11	Estabilidade do Corante Antocianina em Função do pH	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1	Caracterização da Quitosana	29
4.1.1	Determinação de Grau de Desacetilação da Quitosana (%GD)	29
4.1.2	Espectro no Infravermelho da Quitosana	31
4.2	Caracterização do Alginato de Sódio	32
4.2.1	Espectro no Infravermelho do Alginato de Sódio	32
4.3	Espectro de UV-Visível para o Corante Antocianina	33
4.4	Análise no Infravermelho para as Amostras de Quitosana e Quitosana/ Alginato Contendo Corante	34
4.5	Análise Morfológica das Microesferas Utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	36
4.6	Análise Termogravimétrica (TGA) para as Amostras de Quitosana e Quitosana/ Alginato	37
4.7	Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) para as Amostras de Quitosana e Quitosana/ Alginato	39
4.8	Determinação da Quantidade de Corante Impregnado	41
4.9	Estudos de Cinéticos	42
4.9.1	Estudos de Liberação	42
4.9.2	Estabilidade do Corante Antocianina em Função do pH	44
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fórmula estrutural de uma antocianidina genérica. 12
- Figura 2.** Modelo de antocianina ligada a uma unidade glicosídica, e este a um ácido alifático. 13
- Figura 3.** Possíveis mudanças estruturais das antocianidinas em meio aquoso em função do pH. 15
- Figura 4.** Estrutura química da quitina. 16
- Figura 5.** Estrutura química da quitosana. 16
- Figura 6.** Estrutura química do ácido algínico. 18
- Figura 7.** Estrutura química do alginato de sódio. 18
- Figura 8.** Curva de titulação condutimétrica da quitosana. 30
- Figura 9.** Espectro no infravermelho para a quitosana em pastilhas de KBr. 31
- Figura 10.** Espectro no infravermelho para o alginato de sódio em pastilhas de KBr. 32
- Figura 11.** Espectro eletrônico de UV-Vis para o corante antocianina obtido em solução aquosa. 33
- Figura 12.** Espectro no infravermelho para as microesferas de quitosana: a) quitosana, b) microesferas de quitosana impregnadas com corante e c) corante. 35
- Figura 13.** Espectro no infravermelho para as microesferas de quitosana/ alginato: a) quitosana, b) microesferas de quitosana/ alginato impregnadas com corante, c) microesferas de quitosana/ alginato, d) corante e e) alginato de sódio. 35
- Figura 14.** Microscopia Eletrônica de Varredura, a) microesfera de quitosana pura; b) microesfera de quitosana impregnada com corante; c) microesfera de quitosana/ alginato; d) microesfera de quitosana/ alginato impregnada com corante. 36

Figura 15. Análise de TGA: a) corante, b) microesferas de quitosana impregnadas com corante e c) quitosana pura. 37

Figura 16. Análise de TGA: a) corante, b) alginato de sódio, c) 38 microesferas de quitosana/ alginato, d) microesferas de quitosana/ alginato impregnadas com corante e e) quitosana.

Figura 17. Análise de DSC para as microesferas de quitosana: a) 40 quitosana pura, b) microesferas de quitosana impregnadas com corante e c) corante.

Figura 18. Análise de DSC para as microesferas quitosana/ alginato: a) 40 alginato de sódio, b) quitosana pura, c) microesferas de quitosana/ alginato impregnadas com corante e d) corante.

Figura 19. Perfil da curva de liberação do corante a partir de microesferas 42 de quitosana impregnadas em diferentes pHs.

Figura 20. Perfil da curva de liberação do corante a partir de microesferas 43 de quitosana/ alginato impregnadas em diferentes pHs.

Figura 21. Perfil da curva de degradação do corante em diferentes pHs. 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Substituintes R e R' para antocianidinas naturais.	13
Tabela 2. Determinação da quantidade de corante impregnado.	41
Tabela 3. Liberação de 50% do corante a partir das microesferas de quitosana e quitosana/ alginato.	44

LISTA DE ABREVIATURAS

%GD	Grau de desacetilação da quitosana
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máximo de absorção
dTG	Primeira derivada da análise termogravimétrica
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
IV	Espectroscopia no infravermelho
k	Condutância (mS/cm)
M	Unidade de concentração: Molaridade (mol L ⁻¹)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Mt	Quantidade de corante liberado no tempo t
Mf	Quantidade de corante total liberado
TGA	Análise termogravimétrica
V	Volume (L)
V₁	Volume de NaOH empregado para atingir o 1º ponto de equivalência na obtenção do %GD
V₂	Volume de NaOH empregado para atingir o 2º ponto de equivalência na obtenção do %GD
W	Massa de microesferas de quitosana (mg)

RESUMO

Novas fontes de corantes naturais tem sido motivo de intensas pesquisas realizadas com intuito de substituir os corantes sintéticos utilizados pela indústria de alimentos. Porém, a instabilidade dos corantes naturais frente a fatores como pH, oxigênio, luz e temperatura, torna necessário o desenvolvimento de técnicas para reduzir a instabilidade e prolongar o tempo de vida útil destes compostos.

O aparecimento progressivo de restrições na utilização de corantes sintéticos, devido a problemas toxicológicos e/ou alérgicos, favorece o desenvolvimento de novas formas de proteção aos produtos naturais.

Neste trabalho, foi investigada a eficiência dos biopolímeros quitosana e quitosana/ alginato no processo de microencapsulação do corante natural antocianina. Foram preparadas microesferas de quitosana e quitosana/ alginato pelo método de separação de fases via coacervação simples.

O corante foi impregnado nas microesferas de quitosana e quitosana/ alginato a partir do método de impregnação através, da técnica de adsorção por contato. A quantidade de corante impregnado foi determinada por espectrometria eletrônica de UV-Vis. As diferentes amostras de microesferas foram caracterizadas por IV, TGA, DSC e MEV. A microscopia eletrônica de varredura mostra que as microesferas de quitosana impregnadas com corante apresentam fissuras, já as microesferas de quitosana/ alginato impregnadas com corante exibiram porosidade e fissuras.

Os dados experimentais obtidos no estudo de DSC sugerem a existência de uma interação física entre polímero – corante para as microesferas de quitosana/ alginato e de uma interação química para as microesferas de quitosana.

Os estudos cinéticos de liberação do corante a partir da matriz de quitosana indicam uma maior velocidade de liberação do corante em valores de pH mais baixos, sendo observado a maior velocidade de liberação em pH 1,0, já para as microesferas de quitosana/ alginato a velocidade de liberação do corante mais rápida ocorre em pH 5,0.

JUSTIFICATIVA

A percepção dos matizes encontrados na natureza, suas origens e significados despertaram interesse em filósofos e pesquisadores ao longo dos séculos. Do século XV até os dias de hoje, os corantes continuam a ocupar lugar importante na alimentação, pois entre os atributos sensoriais, a cor desempenha um papel preponderante na escolha e seleção de alimentos, levando o consumidor a comprar ou rejeitar um produto. (ARAUJO, 1999).

Geralmente alimentos processados requerem o uso de corantes para melhorar suas características visuais, já que alguns produtos durante o processamento perdem a sua cor natural (HENDRY & HOUGHTON, 1992).

O uso de corantes naturais requer a disponibilidade da matéria-prima e geralmente apresentam baixo rendimento; esta maior elaboração eleva o custo do produto final.

O aumento da prática de colorir alimentos traz também à tona a questão toxicológica, pois grande parte dos corantes atualmente utilizados pela indústria de alimentos são sintéticos. Porém, sabe-se que alguns corantes sintéticos apresentam riscos à saúde humana. Corantes são considerados aditivos para alimentos e definidos pela Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO) como sendo: “toda substância, que não apresenta valor nutritivo, adicionada ao alimento com a finalidade de impedir alterações, manter, conferir ou intensificar seu aroma, cor e sabor; modificar ou manter seu estado físico geral, ou exercer qualquer ação exigida para uma boa tecnologia de fabricação do alimento” (ANTUNES & ARAÚJO, 2000; FOOD..., 1974).

Testes toxicológicos realizados em diversos países, sob vigilância da Organização Mundial de Saúde (OMS), comprovaram que, dependendo do tipo e quantidade consumida, os corantes sintéticos podem provocar uma série de efeitos colaterais, tais como: alergias, disritmias cardíacas, problemas circulatórios, gástricos, oftalmológicos, distúrbios da tireóide, câncer e mutações gênicas. Estes efeitos restringem o uso de corantes sintéticos e faz aumentar cada

vez mais o interesse pelos corantes naturais (IVANISSEVICH & MASSARANI, 1989).

Os corantes naturais podem ser obtidos de diversas fontes como: folhas, frutos e flores e são várias as classes de substâncias que podem colaborar para a coloração dos vegetais, destacando-se as porfirinas, carotenóides e flavonóides, sendo estes últimos os principais agentes cromóforos encontrados nas flores (CAVALHEIRO et al., 1998).

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 CORANTE NATURAL ANTOCIANINA

O pigmento antocianina é um tipo de flavonóide responsável por uma variedade de cores atrativas de frutas, flores e folhas que variam do vermelho ao azul. As antocianinas estão entre os grupos mais importantes de pigmentos naturais extraídos das plantas (HARBORNE, 1967).

A nomenclatura dos pigmentos antocianinas é complexa. O termo antocianina descreve a forma usualmente encontrada na natureza que contém carboidratos. Uma molécula como a antocianina, que contém carboidrato, é classificada como um "glicosídeo". O núcleo principal da molécula de antocianina é constituído por três anéis com ligações duplas conjugadas chamado "aglicona" (livre de açúcar) e também denominado "antocianidina" (CURTRIGHT et al, 1996; TIMBERLAKE & BRIDLE, 1975). A estrutura genérica para uma antocianidina natural é apresentada na **Figura 1**. Dependendo dos substituintes nas posições R e R' define-se uma antocianidina diferente. Uma descrição das principais antocianidinas encontradas na natureza é apresentada na **Tabela 1**.

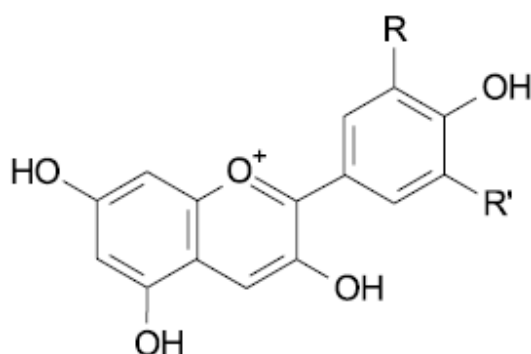


Figura 1 - Fórmula estrutural de uma antocianidina genérica (TIMBERLAKE & BRIDLE, 1975).

Tabela 1 - Substituintes R e R' para antocianidinas naturais

Antocianidina*	R	R'
cianidina	OH	H
delfinidina	OH	OH
malvidina	OCH ₃	OCH ₃
pelargonidina	H	H
peonidina	OCH ₃	H
petunidina	OCH ₃	OH

*As estruturas correspondentes são relacionadas com a fórmula estrutural genérica apresentada na **Figura 1**.

A molécula de antocianina é composta normalmente de duas ou três partes: uma estrutura básica não glicosilada denominada antocianidina (aglicona), uma ou mais moléculas de açúcares e freqüentemente, uma ou mais moléculas de ácidos, ligado aos açúcares, como ilustra a **Figura 2** (HARBORNE, 1967; BROUILLARD, 1982; FRANCIS & MARKAKIS, 1989; WONG, 1995). A glicosilação ocorre normalmente na posição 3, 5 e 7 (LEE, 1992).

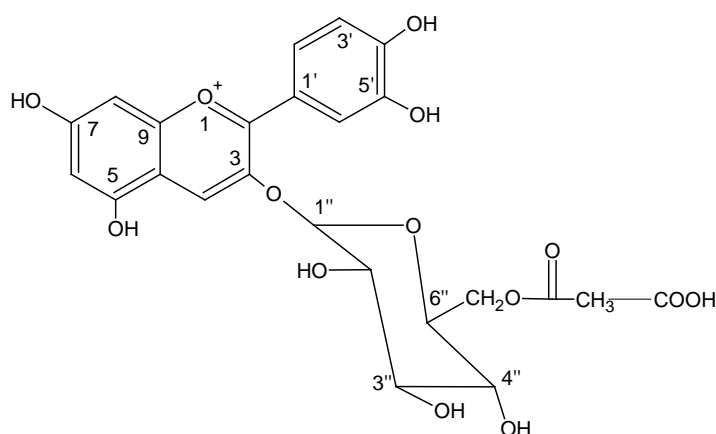


Figura 2 – Modelo de antocianina ligada a uma unidade glicosídica, e este a um ácido alifático (HARBORNE, 1967; BROUILLARD, 1982; FRANCIS & MARKAKIS, 1989; WONG, 1995).

A velocidade de degradação varia grandemente entre as antocianinas, em razão da sua diversidade de estrutura. Geralmente, o aumento da hidroxilação diminui a estabilidade, enquanto o aumento de metilação a aumenta. A cor dos

alimentos contendo antocianinas ricas em pelargonidina, cianidina ou delphinidina aglicona é menos estável que a dos alimentos contendo antocianinas ricas em petunidina ou malvidina aglicona. O aumento da estabilidade deste último grupo ocorre devido ao fato de os grupos hidroxilados estarem bloqueados (ARAUJO, 1999; MAZZA & BROUILLARD, 1987).

A propriedade das antocianinas apresentarem cores diferentes, dependendo do pH do meio em que elas se encontram, faz com que estes pigmentos possam ser utilizados como indicadores naturais de pH (MEBANE, 1985; BARRY, 1997). As mudanças estruturais que ocorrem com a variação do pH são responsáveis pelo aparecimento das espécies com colorações diferentes, incluindo o amarelo em meio fortemente alcalino, e podem ser explicadas pelo esquema das principais transformações ilustradas na **Figura 3** (TIMBERLAKE & BRIDLE, 1975; BROUILLARD, 1982).

Freqüentemente podem-se encontrar vários pigmentos nos tecidos de uma planta compostos pela mesma antocianidina, mas diferindo no glicosídeo. Os açúcares encontrados com maior freqüência ligados as antocianidinas em ordem de ocorrência são: glicose, ramnose, xilose, galactose, arabinose e frutose (FRANCIS & MARKAKIS, 1989), que podem estar presentes como monoglicosídeos e triglicosídeos substituídos em C-5, C-7, C-3', C-4' e C-5', entretanto se houver somente um açúcar, este estará preferencialmente na posição C-3, que confere a molécula maior estabilidade e solubilidade. Poucos pigmentos tem sido encontrados contendo carboidratos ligados nas posições 4 e 6 da aglicona (BROUILLARD, 1982; JACKMAN et al., 1987; MARKWELL et al., 1996).

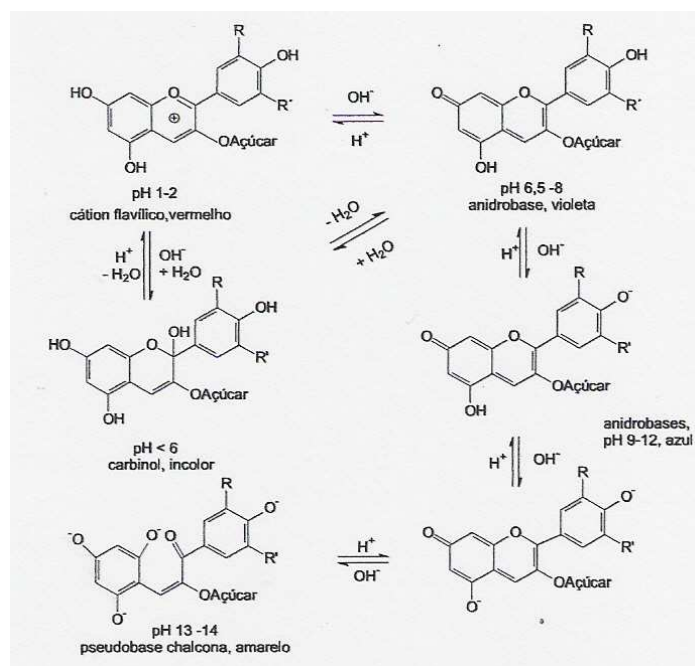


Figura 3 – Possíveis mudanças estruturais das antocianidinas em meio aquoso em função do Ph (TIMBERLAKE & BRIDLE, 1975; BROUILLARD, 1982).

A estabilidade das antocianinas apresenta limitações para a indústria alimentícia devido a sua degradação na presença de metais, ácido ascórbico, açúcar, oxigênio, luz, temperatura e enzimas (ARAUJO, 1999), porém não impede sua utilização em alimentos, uma vez que se tem demonstrado a sua viabilidade na indústria (KEARSLEY & RODRIGUEZ, 1981).

1.2 QUITINA E QUITOSANA

A quitina é um polímero natural, sendo muito semelhante à celulose encontrada em muitas espécies de animais marinhos e plantas inferiores. Está localizada em toda a parede celular de leveduras e exoesqueleto de invertebrados como: camarão, siri, caranguejos e insetos; é obtido, comercialmente a partir de cascas de crustáceos. Sua unidade básica é o monômero N-acetilglicosamina, sendo, portanto chamada de: β -(1→4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose,

apresentando um grau de N-acetilação variável, estando na faixa de 90% (FURLAN, 1997). A **Figura 4**, mostra a estrutura química da quitina:

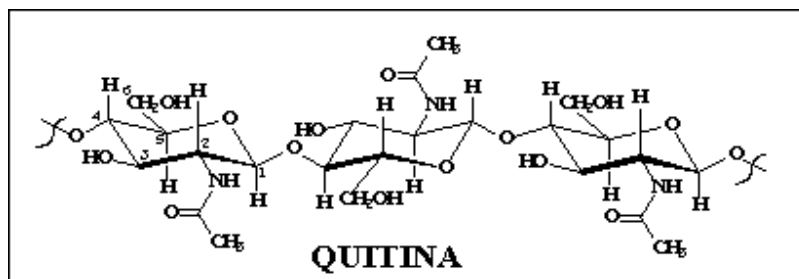


Figura 4 – Estrutura química da quitina (FURLAN, 1997).

A quitosana é o derivado da quitina, obtido a partir de reação de desacetilação em meio alcalino. Partindo-se da quitina (**Figura 4**), através de um primeiro tratamento com hidróxido de sódio concentrado, ocorre a desacetilação das ligações N-acetil. Após a dissolução do material obtido em ácido acético e precipitação em hidróxido de sódio, obtém-se a quitosana (KITUR & THARANATHAN, 2003; KIMURA, 2001; FURLAN, 1997).

A quitosana é um biopolímero de alto peso molecular constituído predominantemente das unidades β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose, apresentando em sua cadeia aproximadamente 70 – 90% de grau de desacetilação (FURLAN, 1997). A **Figura 5**, mostra a estrutura química da quitosana.

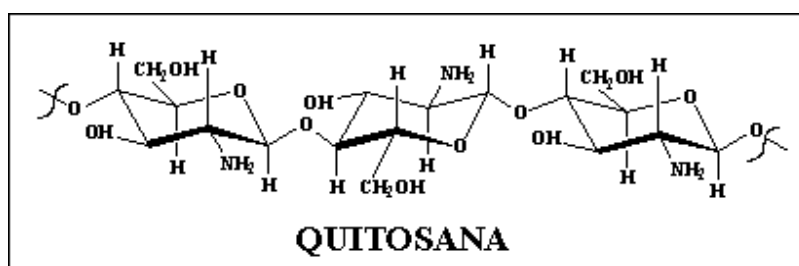


Figura 5 – Estrutura química da quitosana (FURLAN, 1997).

A transformação da quitina em quitosana modifica suas propriedades, de modo que a quitosana é insolúvel em água e solúvel na maior parte dos ácidos

orgânicos, como por exemplo, o ácido acético e fórmico e também em ácidos inorgânicos como o ácido clorídrico (MATHUR & NARANG, 1990).

Os grupos amino presentes em toda a extensão da cadeia polimérica, dão a quitosana um caráter de polieletrólito catiônico ($pK_a \approx 6,5$), fazendo com que o polímero seja solúvel em soluções com o $pH < 6,5$ (MUZZARELLI, 1973; KRAJEWSKA, 2004).

Devido à presença de grupos amino livres na quitosana e também a sua solubilidade frente a soluções aquosas de certos ácidos minerais e ácido acético, este polímero é caracterizado por ser mais versátil quimicamente quando comparado com o seu análogo quitina. A quitosana forma soluções viscosas em meio ácido, não tóxicas e biodegradáveis. Em função destas características, a matriz de quitosana apresenta grande possibilidade de formar filmes, fibras e membranas de microcápsulas (MUZZARELLI, 1973; MATHUR & NARANG, 1990).

A quitosana pode ser empregada como: suporte de drogas para uso oral, aplicações na agricultura (tratamento de sementes, inseticidas), processamento de alimentos e biotecnologia, produção de papel, têxtil, produtos fotográficos, agentes quelantes de metais pesados (Cd, Hg, Pb, Cr, Ni) e como adsorvente de corantes (SANFORD & HUTCHINGS, 1997; CHEN, TSAIH & LIN, 1996).

1.3 ALGINATO DE SÓDIO

O ácido algínico é um copolímero extraído das algas marinhas pardas, derivado do ácido D-manurônico (M) e do ácido L-gulurônico (G), **Figura 6**, os quais contêm em suas estruturas grupos carboxílicos que possibilitam a ligação dos metais catiônicos tais como: sódio, cálcio e cobre (SOARES, et al., 2004; KADOKAWA, et al., 2005). A **Figura 7**, mostra a estrutura do alginato de sódio.

O alginato do sódio é um polieletrólito usado extensivamente em vários campos, tais como nas indústrias alimentícias e têxteis. Embora o alginato de sódio seja solúvel em água, os alginatos insolúveis em água podem ser

preparados substituindo os íons sódio por cátions di- e trivalentes (NAKAMURA et al., 1995).

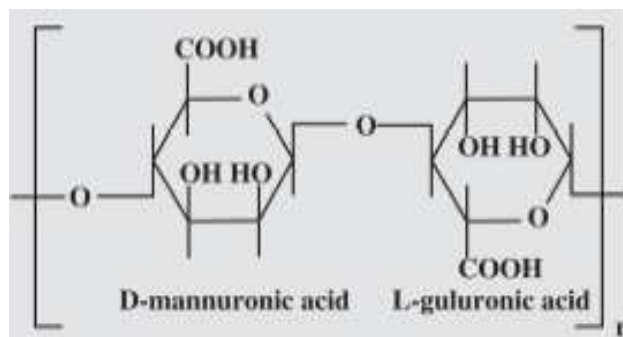


Figura 6 – Estrutura do ácido algínico (SOARES, et al., 2004; KADOKAWA, et al., 2005).

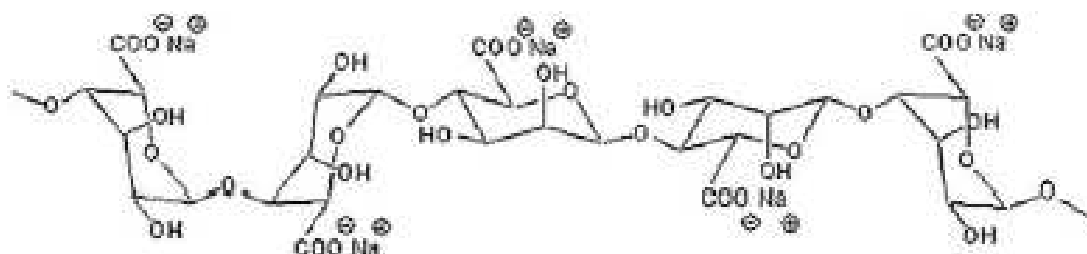


Figura 7 – Estrutura do alginato de sódio (SOARES, et al., 2004; KADOKAWA, et al., 2005).

O alginato é um polissacarídeo aniônico com estrutura similar a quitosana também considerado biocompatível em uma escala dos usos para a indústria de alimentos. Quando misturado em solução ácida tem a forma de um complexo polieletrônico (NOTARA, et al., 2004).

As propriedades biológicas dos polissacarídeos, em especial dos alginatos, foram exploradas desde muitas décadas em aplicações médicas e cirúrgicas incontáveis. A solubilidade em água se dá devido à presença de íons inorgânicos na estrutura do alginato. Devido a suas propriedades físicas e químicas o alginato de sódio, é usado extensivamente no processamento de alimentos, em intervenções médicas e nas indústrias farmacêuticas como suporte para liberação de drogas, além de ser empregado na preparação de géis. Os dados toxicológicos mostram que os alginatos são seguros quando usados no alimento. O ácido algínico e derivados são usados como estabilizadores e espessantes facilitando a dissolução e melhorando a viscosidade dos ingredientes impedindo a formação de

cristais que prejudicarão a aparência e a homogeneidade de produtos alimentícios (SOARES, et al., 2004).

1.4 MICROENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação é um processo de formação de partículas onde um ingrediente ativo (núcleo) é recoberto por uma fina camada de outro material. O material de parede ou encapsulante deve formar um filme ininterrupto para proteger o ingrediente (HEGENBART, 1993). A microencapsulação é usada para prover as seguintes características a um ingrediente:

- liberação controlada: o encapsulante libera o núcleo sobre condições específicas como, mudança de pH, aplicação de calor ou mastigação;
- proteção contra luz, calor, água e oxidação, permitindo usar menor quantidade de um ingrediente lábil que seja degradado sob utilização normal;
- manuseio e estocagem: é possível encapsular um ingrediente líquido transformando-o em pó.

Nos alimentos, a microencapsulação emprega formulações contendo o ingrediente a ser preservado em combinações com agentes encapsulantes e/ou modificadores, como antioxidantes, quelantes e surfactantes. Os encapsulantes mais comuns são hidrocolóides de gomas vegetais, gelatina, amido modificado, dextrinas, lipídeos e emulsificantes e algumas fontes alternativas como a quitosana, obtida a partir da quitina, extraída da casca de crustáceos, **Tabela 2.** (DZIEZAK, 1988; SHAHIDI & HAN, 1995).

A escolha do encapsulante dependerá das propriedades químicas e físicas do ingrediente encapsulado, do processo utilizado para formar a microcápsula e das propriedades desejadas. Este material pode ser selecionado a partir de uma grande variedade de polímeros naturais ou filmes sintéticos. O encapsulante representa em geral, de 1 a 70% do peso da microcápsula, podendo apresentar uma espessura de até 200µm; essa espessura é manipulada de modo a promover alteração na permeabilidade da microcápsula (SPARKS, 1981; DZIEZAK, 1988).

A finalidade básica da encapsulação na indústria de alimentos é proteger os ingredientes encapsulados. Em algumas técnicas, a cápsula pode ser também, projetada para liberar lentamente o produto, com o passar do tempo ou até que determinada condição físico-química seja alcançada. Devido à exposição à luz, ao oxigênio, ao meio ou a evaporação, a encapsulação pode ser utilizada para prevenir a degradação de ingredientes (RISH, 1995).

Atualmente, existem diversos métodos para preparação ou obtenção de microcápsulas, os quais podem ser classificados em: a) métodos físicos: spray drying, spray chiling, spray cooling, extrusão, extrusão centrífuga de multiorifícios, cocrystalização e liofilização, b) métodos químicos: inclusão molecular e polimerização interfacial, c) métodos físico-químicos: coacervação, separação de fase orgânica e formação de lipossomas (KING, 1995; BENITA, 1996).

Na indústria de alimentos, microcápsulas contendo compostos voláteis (responsáveis pelo implemento do aroma e sabor), corantes, acidulantes, enzimas, microrganismos probióticos e agentes anti-fúngicos tem sido empregados (WERNER, 1980; REINECCIUS, 1989; SHAHIDI & HAN, 1995). Com relação aos corantes a técnica de microencapsulação pode ser utilizada visando melhorar a solubilidade, facilitar o manuseio e aumentar a estabilidade.

1.5 LIBERAÇÃO CONTROLADA

A liberação controlada pode ser definida como um método pelo qual um ou mais agentes ou ingredientes ativos, são disponibilizados em períodos de tempos específicos. Nos alimentos, a liberação controlada atua mediante alguns estímulos do meio tais como, aquecimento, luz e controle de pH. A introdução de aditivos nos alimentos a partir deste método, é feita através de sistemas denominados microcápsulas (POTHAKAMURY, 1995).

A liberação do conteúdo das microcápsulas pode ocorrer através de ruptura mecânica, da ação da temperatura, pela ação do pH, pela solubilidade do meio, através da biodegradação e também por difusão. Em geral, a liberação da

substância “ativa” depende do tipo de geometria da partícula e do material utilizado para formar a microcápsula. As liberações por solventes e por difusão são os mecanismos de liberação mais relevantes (WHORTON & REINECCIUS, 1995).

A liberação por difusão, é estritamente regida por propriedades químicas e físicas do agente encapsulante, tais como estrutura da matriz e tamanho dos poros (WHORTON, 1995). A maioria das microcápsulas tem paredes finas que funcionam como uma membrana semipermeável. Dessa forma, na ausência de fissuras e falhas na parede, a liberação do componente ativo por difusão se dá por gradiente de concentração e forças atrativas intermoleculares. A difusão pela parede depende além do gradiente de concentração, do tamanho, forma e polaridade do material ativo, assim como a interação entre este e a membrana (SHAHIDI & HAN, 1995).

A liberação por solvente é baseada na solubilização do agente encapsulante seguido por subsequente liberação do ingrediente encapsulado. Essa liberação, pode ser ocasionada por uma ruptura repentina ou pelo intumescimento do agente encapsulante, cujos responsáveis são os efeitos do pH ou as mudanças na força iônica do meio (WHORTON, 1995).

2.OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o processo de microencapsulação do corante natural de antocianina com quitosana e quitosana/ alginato através do método de impregnação e estudar o comportamento de liberação em função do tempo, a fim de determinar o efeito do pH na estabilidade do corante.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I) caracterizar o biopolímero quitosana através da porcentagem de grupos amino (%GD);
- II) preparar microesferas de quitosana e quitosana/ alginato, pelo método da separação de fases ou coacervação;
- III) caracterizar as microesferas em relação ao tamanho e morfologia por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- IV) microencapsular o corante natural antocianina pelo método de impregnação, através da técnica de adsorção por contato;
- V) avaliar a estabilidade do corante livre e encapsulado em função do pH.
- VI) estudar a morfologia do material formado entre quitosana e quitosana/ alginato com o corante, através de microscopia eletrônica de varredura;
- VII) analisar as cinéticas de liberação do corante microencapsulado em diferentes pHs;
- VIII) estudar as interações que ocorrem entre polímero-corante, através de técnicas espectroscópicas: UV-Vis, IV e análises térmicas (TGA e DSC).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

O biopolímero quitosana foi fornecido pela Purifarma, Brasil. O corante natural de antocianina (AC 12r WS P) extraído da casca de uva (*Vitis vinifera* L.) foi fornecido pela Christen – Hansen Ind. & Com. Ltda. Todos os outros reagentes utilizados são de grau analítico.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO DA QUITOSANA (%GD)

O teor de grupos amino presentes na quitosana, foi determinado através de titulação condutimétrica, utilizando-se o método de RAIMOND (1993), que consiste na dissolução da quitosana (200 mg) na presença de 20 mL de HCl 0,3 mol.L⁻¹, sendo em seguida diluído com 200 mL de água destilada para uma boa dispersão do polímero na solução. Conduziu-se a titulação com NaOH 0,1 mol.L⁻¹, através de adições de 0,2 mL de titulante até o volume final de 100 mL. A titulação condutimétrica foi feita em triplicata utilizando-se um titulador automático da marca Schott Gerate, modelo T80/20 e um condutivímetro da marca Mettler Toledo, modelo MC 226.

3.2.2. PREPARAÇÃO DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA

As microesferas de quitosana foram preparadas a partir da dissolução de 3,0 g de quitosana em 100 mL de ácido acético 5,0% (v/v), mantendo-se sob agitação até a completa homogeneização da solução, resultando em uma solução viscosa com aproximadamente 3,0% (m/v) de quitosana. A solução de quitosana foi gotejada, com auxílio de uma bomba peristáltica, Ismatec Reglo modelo 78016-30, em um banho de precipitação, contendo solução de NaOH 2,0 mol.L⁻¹. Através do fenômeno de separação de fases, via coacervação simples que consiste em um fenômeno de superfície devido à interação da solução polimérica (solução de quitosana e o meio coagulante (solução de hidróxido de sódio), que induz a separação de fases, precipitando a membrana polimérica. As microesferas geleificadas foram lavadas com água destilada até pH 7,0 e secas a vácuo.

3.2.3. PREPARAÇÃO DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA/ ALGINATO

As microesferas de quitosana/ alginato foram preparadas a partir da dissolução de 0,8 g de alginato de sódio em 20 mL de água (4,0% m/v), mantendo-se sob agitação até a completa homogeneização da solução, resultando em uma solução viscosa. A solução de alginato de sódio foi gotejada, com auxílio de uma bomba peristáltica, Ismatec Reglo modelo 78016-30, em um banho de precipitação, contendo solução de cloreto de cálcio 0,5 mol.L⁻¹. Através do fenômeno de separação de fases ocorreu a precipitação das microesferas que foram filtradas e colocadas em uma solução de quitosana 3,5% (m/v), sob agitação por aproximadamente 4 minutos. As microesferas geleificadas foram lavadas com água destilada e secas a vácuo.

3.2.4. IMPREGNAÇÃO DO CORANTE EM MICROESFERAS DE QUITOSANA E QUITOSANA/ ALGINATO

As microesferas de quitosana e quitosana/ alginato foram impregnadas com o corante antocianina de acordo com a técnica de adsorção por contato. 150 mg do corante foram dissolvidos em solução tampão de H_2SO_4 $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 2,0$, sendo a solução resultante, colocada em contato com as microesferas de quitosana e quitosana/ alginato, separadamente, para impregnação por 24 horas a 25°C , sob agitação. Após o contato, as microesferas foram lavadas com água para remoção do excesso de corante, e em seguida filtradas e secas a vácuo.

3.2.5. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (IV)

Amostras de microesferas de quitosana e quitosana/ alginato puras e microesferas resultantes dos métodos de microencapsulação foram pulverizadas para análise através da espectroscopia no infravermelho. O espectro no infravermelho foi obtido na região de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ com um espectrofotômetro FT Perkin Elmer – modelo 16 PC, utilizando-se pastilhas de KBr.

3.2.6. MORFOLOGIA DAS MICROESFERAS

A morfologia externa, porosidade e tamanho médio das microesferas de quitosana e quitosana/ alginato puras e das microesferas contendo o corante foram determinadas empregando-se a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras foram colocadas em suportes, recobertas com ouro e micrografadas. O diâmetro médio de cada amostra foi obtido a partir da média de uma população de microesferas, utilizando-se medidas dos diâmetros dos eixos vertical e horizontal. Para todas as amostras, foram analisados cortes

transversais, para avaliar as características internas de cada amostra. As amostras foram analisadas empregando-se um microscópio eletrônico de varredura, marca Philips, modelo XL 30, do Laboratório de Materiais (LabMat) do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.2.7. ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS (TGA)

A termogravimetria é uma técnica que se baseia na medida de perda de massa de uma determinada amostra em função da temperatura ou do tempo. Os termogramas, bem como as curvas originadas pela primeira derivada (dTG), fornecem informações importantes sobre a estabilidade térmica do material analisado (SKOOG et al., 1991).

As amostras foram analisadas utilizando-se um Analisador Termogravimétrico Shimadzu TGA 50. As análises foram efetuadas sob atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 50,0 mL/min e velocidade de aquecimento de 10°C/min numa faixa de temperatura de 25°C a 800°C.

3.2.8. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

A técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC) é empregada para determinar a entalpia deste processo. O processo consiste no aquecimento de uma amostra sendo que a temperatura tem um aumento linear em função do tempo.

As amostras foram analisadas utilizando-se um Analisador Shimadzu DSC 50, sob atmosfera de nitrogênio, com taxa de aquecimento de 10°C/min na faixa de temperatura de 25°C a 350°C.

3.2.9. DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE CORANTE IMPREGNADO

Foram utilizados para este estudo 15 mg de cada uma das amostras impregnadas como descrito nos itens 3.2.2 e 3.2.3. As amostras foram deixadas em contato com solução tampão HCl $0,1\text{mol.L}^{-1}$ (pH 1,0), por 1,5 horas, e 3,0 horas para as microesferas de quitosana e quitosana/ alginato, respectivamente. Após o contato, uma alíquota de 3,0 mL foi retirada de cada solução e analisada no comprimento de onda máximo do corante (524 nm), utilizando-se um espectrofotômetro UV-Vis modelo U-2000, marca Hitachi. Para a quantificação dos resultados, utilizou-se uma curva de calibração do corante puro em solução aquosa pH 1,0, sendo a análise realizada em triplicata.

3.2.10. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO

Amostras (25,0 mg) de microesferas de quitosana e quitosana/ alginato obtidas através dos métodos de impregnação, foram suspensas em 25,0 mL de tampão pH 1,0 (HCl $0,1\text{mol.L}^{-1}$), 2,0 (HCl $0,1\text{mol.L}^{-1}$), 3,0 (CH_3COOH $0,1\text{mol.L}^{-1}$), 4,0 (CH_3COOH $0,1\text{mol.L}^{-1}$) e 5,0 (CH_3COOH $0,1\text{mol.L}^{-1}$); o pH dessas soluções foram ajustados com NaOH $0,1\text{mol.L}^{-1}$. As soluções foram mantidas sob agitação constante (150 rpm) em banho termostatizado a $25,0 \pm 0,1$ °C . Após intervalos de tempo pré-determinados, 3,0 mL da amostra, foram analisados no comprimento de onda máximo do corante, $\lambda_{\text{máx}}$ 524 nm. Depois das leituras, a solução foi devolvida ao erlenmeyer. A porcentagem de corante liberada foi determinada usando-se uma curva de calibração que relaciona a absorbância com a concentração conhecida do corante (mg%) no mesmo tampão em que a cinética foi conduzida, sendo o experimento realizado em triplicata para cada pH.

3.2.11 ESTABILIDADE DO CORANTE ANTOCIANINA EM FUNÇÃO DO pH

Foram preparadas soluções contendo 2,0 mg de corante puro dissolvidas em 25 mL de tampão pH 3,0 (CH_3COOH $0,1\text{mol.L}^{-1}$), 4,0 (CH_3COOH $0,1\text{mol.L}^{-1}$) e 5,0 (CH_3COOH $0,1\text{mol.L}^{-1}$). As soluções foram mantidas sob agitação constante. Após intervalos de tempos pré-determinados, 3,0 mL da solução, foram analisados no comprimento de onda máximo do corante, $\lambda_{\text{máx}}$ 524 nm. A quantidade de corante degradado com o tempo foi determinada através de uma curva de calibração do corante. O experimento foi realizado em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos envolvendo os biopolímeros quitosana e alginato com o intuito de proporcionar um aumento na estabilidade do corante natural antocianina iniciou-se com a caracterização dos biopolímeros através de técnicas espectroscópicas IV e análises térmicas TGA e DSC. Algumas destas caracterizações serão apresentadas e discutidas em conjunto com os resultados das análises dos produtos microencapsulados. Seguidamente, estudou-se a liberação do corante natural antocianina a partir das microesferas de quitosana e quitosana/ alginato em condições pré-determinadas de pH.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

4.1.1 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO DA QUITOSANA (% GD)

Uma das mais importantes propriedades é o grau de desacetilação, o qual determina se o polímero é quitina ou quitosana, arbitrariamente, o grau de desacetilação ≥ 40 define o material polimérico como quitosana (TAN et al., 1998).

Vários métodos são descritos para a determinação do grau de desacetilação da quitosana, sendo a titulação condutimétrica o método escolhido em função da simplicidade do método e de sua precisão. A maneira como a titulação foi conduzida já foi descrita anteriormente no item 3.2.1. A curva dos valores de condutância, k , versus volume de titulante apresenta dois pontos de inflexão conforme mostra a **Figura 8**.

A curva de titulação apresenta dois pontos de inflexão, sendo o primeiro correspondente a neutralização de HCl em excesso na solução e o segundo referente à neutralização do polímero protonado. A diferença entre os dois pontos

de equivalência corresponde ao volume de base requerido para neutralizar os grupos amino. A porcentagem de grupos amino foi calculada pela equação:

$$\% \text{ GD} = \frac{M(V_2 - V_1)161}{W} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

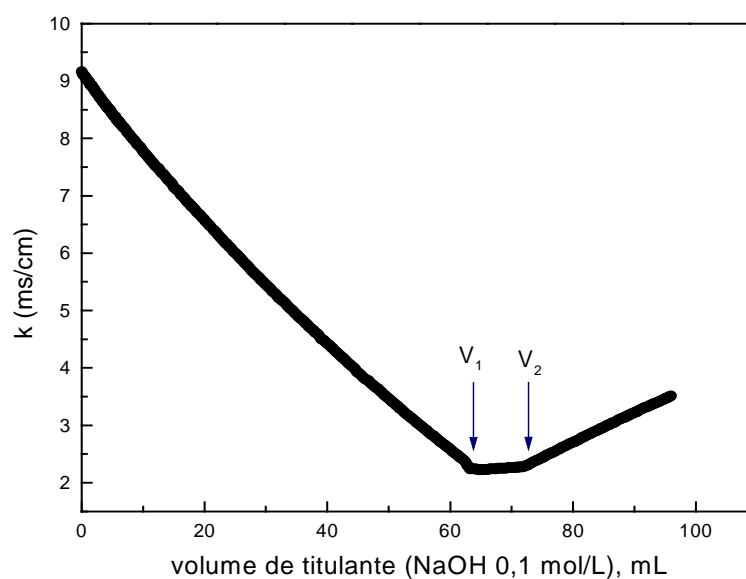


Figura 8 – Curva de titulação condutimétrica da quitosana.

Onde: M é a concentração da solução de NaOH; V_1 (62,70mL) e V_2 (72,97mL) são os volumes de NaOH em mL, empregados para neutralizar o excesso de ácido clorídrico e a quitosana protonada; 161 é a massa de uma unidade monomérica do polímero em g. mol⁻¹ e W é a massa de amostra em mg empregada na titulação. O grau de desacetilação calculado por este método foi de 82,75%, sendo que este valor representa a média de três determinações.

4.1.2 ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA QUITOSANA

Através da análise do espectro no infravermelho da quitosana (**Figura 9**), observa-se a presença dos picos referentes aos grupos funcionais existentes na cadeia polimérica, tais como, OH, NH₂ e C=O, sendo ainda uma contribuição da quitina. Observa-se para a quitosana as principais bandas: 3448 cm⁻¹ banda de estiramento da ligação –OH; 2922 e 2865 cm⁻¹ bandas de estiramento C–H. As bandas em 1654 e 1545 cm⁻¹ referem-se ao estiramento C=O de amida secundária, e as vibrações de deformação de N–H de amina primária, respectivamente. A banda em 1388 cm⁻¹ refere-se à vibração pequena do C–H do grupo CH₃ referente ao grupo acetamido ainda presente em pequena proporção na cadeia polimérica e em 1026 cm⁻¹ estiramento C–O de álcool primário. Através da análise de infravermelho comprova-se a presença de todos os grupos funcionais da quitosana mostrando que a análise no infravermelho é útil para a caracterização do polímero.

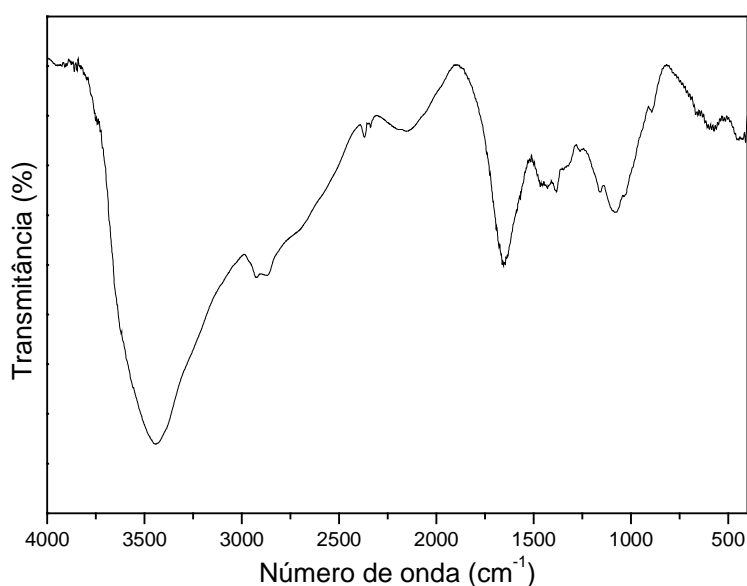


Figura 9 – Espectro de infravermelho para a quitosana em pastilhas de KBr.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ALGINATO DE SÓDIO

4.2.1 ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO ALGINATO DE SÓDIO

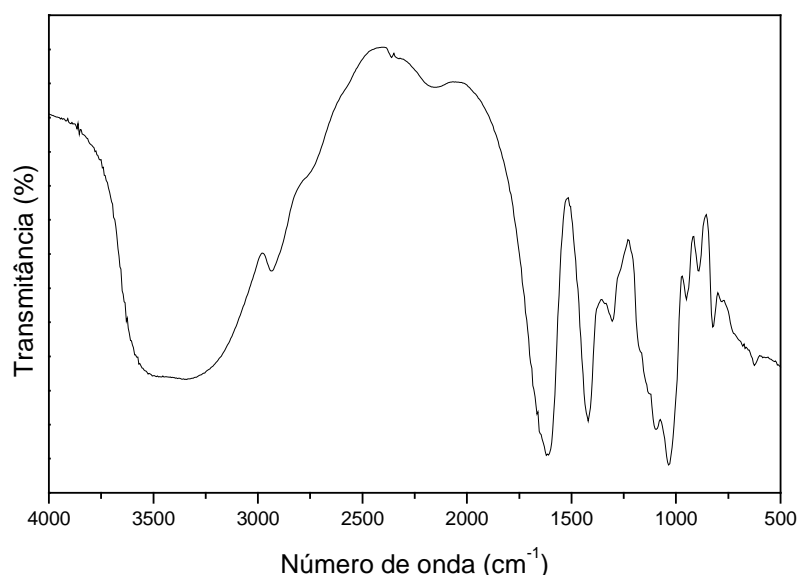


Figura 10 – Espectro de infravermelho para o alginato de sódio em pastilhas de KBr.

O espectro no infravermelho obtido para o alginato de sódio (**Figura 10**), na faixa de 4000 – 500 cm^{-1} , mostra dois picos em 1614 e 1417 cm^{-1} os quais são atribuídos aos estiramentos simétrico e assimétrico do grupo carboxilato livre, respectivamente. A banda em 1031 cm^{-1} refere-se ao estiramento C–O–C e a banda em 820 cm^{-1} ao estiramento C–O, relativo aos ácidos manurônico e gulorônico como registrado por Hyang e Yeom (HYANG et al., 1999; YEOM et al., 1998)

4.3 ESPECTRO DE UV – VISÍVEL PARA O CORANTE ANTOCIANINA

O espectro de UV–Vis do corante antocianina e seu respectivo comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) são mostrados na **Figura 11**. A partir do espectro de absorção da solução do corante e medindo a absorbância na faixa do espectro de 300 a 800 nm, o valor de $\lambda_{\text{máx}}$ foi determinado em 524 nm. Os espectros apresentam o mesmo comportamento em toda a faixa de pH estudado.

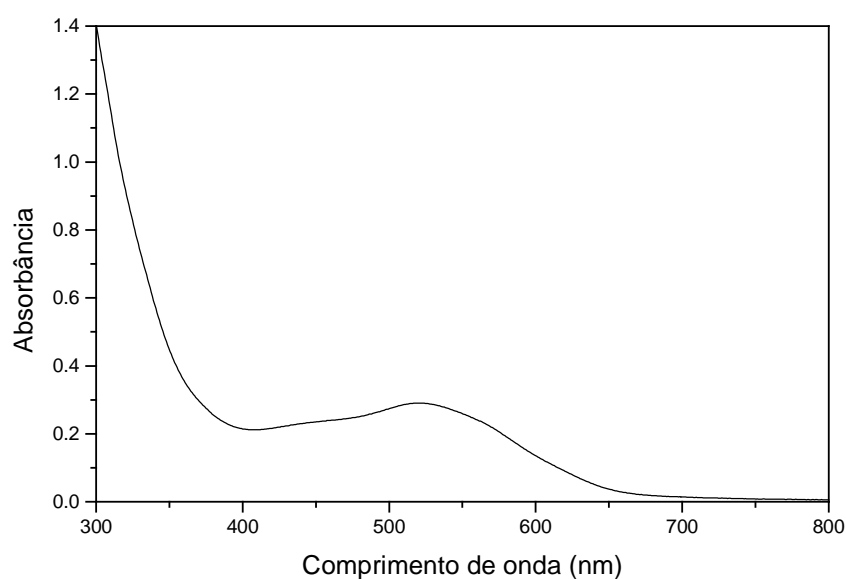


Figura 11 – Espectro eletrônico UV-Vis para o corante antocianina obtido em solução aquosa.

Foram também realizadas, para o corante, análises de espectroscopia no infravermelho para caracterização estrutural, calorimetria de varredura diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TGA), sendo as duas últimas utilizadas para observar a influência da temperatura sobre o corante. Estas análises serão discutidas juntamente com as análises dos produtos resultantes da microencapsulação do corante.

4.4 ANÁLISE NO INFRVERMELHO PARA AS AMOSTRAS DE QUITOSANA E QUITOSANA/ ALGINATO CONTENDO CORANTE

As amostras preparadas de acordo com os métodos descritos nos itens 3.2.2 e 3.2.3 foram analisadas no infravermelho, para a observação de possíveis interações entre o polímero e o corante utilizado. Amostras de microesferas de quitosana e quitosana/ alginato que foram adsorvidas por contato com o corante, foram trituradas e posteriormente analisadas no infravermelho em pastilha de KBr, e os espectros resultantes estão ilustrados nas **Figuras 12 e 13**.

Ao ser analisado os espectros no infravermelho das amostras de microesferas de quitosana e quitosana/ alginato contendo o corante não se observa mudanças significativas nestes espectros quando comparados com os espectros das amostras de quitosana e alginato puros.

O espectro no infravermelho das amostras de microesferas de quitosana/ alginato não mostra a presença de interações químicas entre os biopolímeros quitosana e alginato as quais poderiam ser evidenciadas baseando-se na interação eletrostática entre o grupo carboxilato do alginato e o grupo amino da quitosana, **Figura 13c**.

Observa-se a partir das **Figuras 12b e 13b** que os picos referentes aos grupos funcionais do polímero se encontram preservados sugerindo desta maneira que nestes sistemas ocorre apenas uma interação física, onde o polímero atua como agente encapsulante do corante mantendo as características do mesmo.

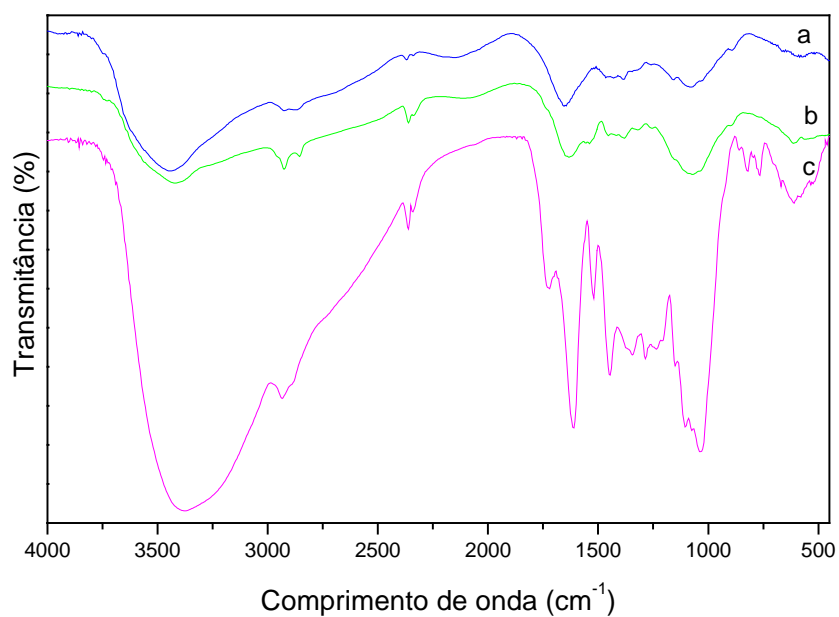


Figura 12 – Espectro no infravermelho para as microesferas de quitosana: a) quitosana, b) microesferas de quitosana impregnadas com corante e c) corante.

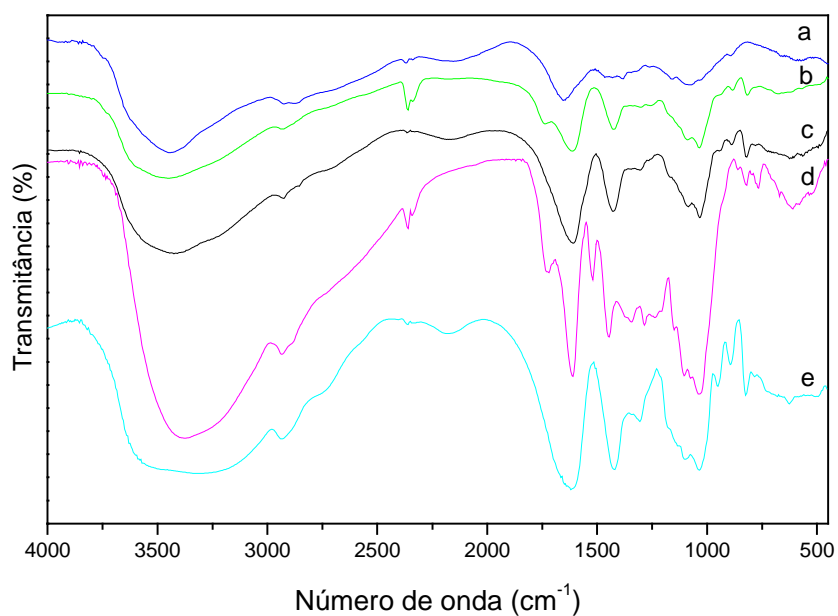


Figura 13 – Espectro no infravermelho para as microesferas de quitosana/ alginato: a) quitosana, b) microesferas de quitosana/ alginato impregnadas com corante, c) microesferas de quitosana/ alginato, d) corante e e) alginato de sódio.

4.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS MICROESFERAS UTILIZANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura fornece informações sobre as características morfológicas das microesferas como a presença de fissuras e poros, permitindo uma análise rápida e direta de eficiência do processo de encapsulação.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura revelam a partir de uma população mista de microesferas, o tamanho das partículas e permite visualizar o aspecto das microesferas. As microesferas em geral apresentaram boa esfericidade. A análise da morfologia externa das microesferas impregnadas com o corante revelou a presença de fissuras e ausência de poros para as amostras de quitosana e a presença de fissuras e rugosidade para as amostras de quitosana/ alginato, como mostra a **Figura 14**. A presença de fissura pode comprometer a proteção oferecida ao corante.

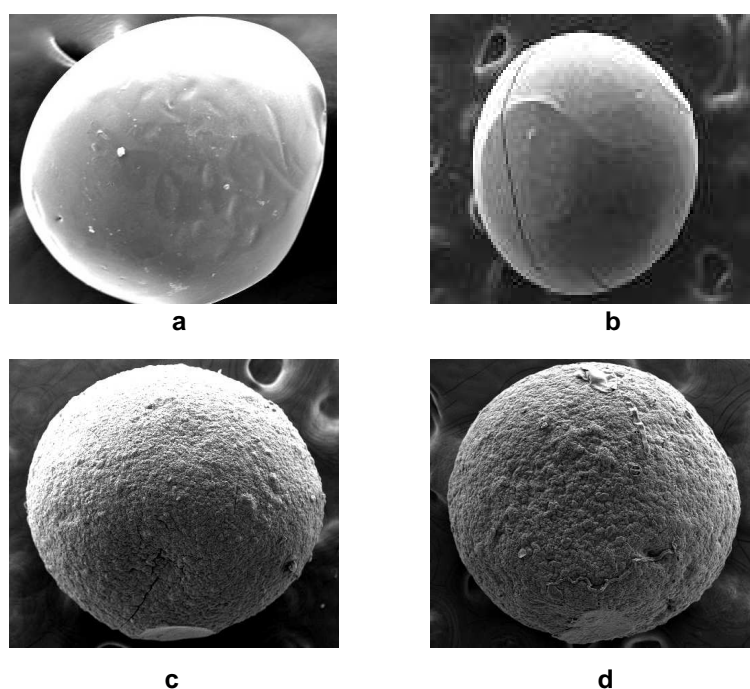


Figura 14 – Microscopia Eletrônica de Varredura, a) microesfera de quitosana pura; b) microesfera de quitosana impregnada com corante; c) microesfera de quitosana/ alginato; d) microesfera de quitosana/ alginato impregnada com corante.

A média de tamanho para as microesferas foi: 873 μm para a amostra de quitosana impregnada com corante, 956 μm para a amostra de quitosana/ alginato impregnada com corante, sendo que para as amostras de microesferas não impregnadas o tamanho para as de quitosana foi de 758 μm e para as de quitosana/ alginato foi de 974 μm .

4.6 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) PARA AS AMOSTRAS DE QUITOSANA E QUITOSANA/ ALGINATO

As microesferas de quitosana impregnadas com corante foram caracterizadas por análise termogravimétrica (TGA), **Figura 15**. Para efeito de comparação é apresentado também a análise termogravimétrica do corante e de quitosana pura.

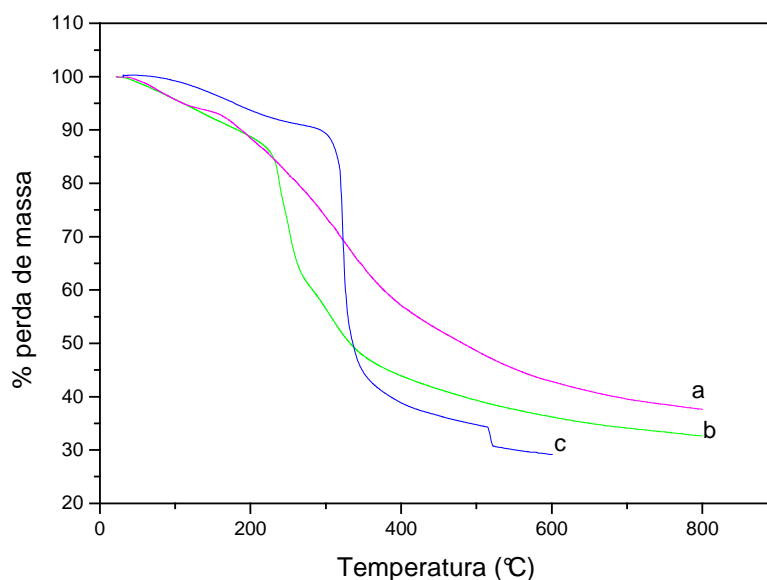


Figura 15 – Análise de TGA: a) corante, b) microesferas de quitosana impregnadas com corante e c) quitosana pura.

A partir da **Figura 15a**, observa-se que o corante antocianina sofre inicialmente um processo de desidratação em 89,91°C, seguido por uma única

etapa de decomposição em 316,91°C. As microesferas de quitosana sem corante sofrem um processo de desidratação em 154,90°C e um a etapa de decomposição em 319,17°C, **Figura 15c**. Para as microesferas de quitosana impregnadas com o corante observa-se que, sob aquecimento e nitrogênio, inicialmente ocorre um processo de desidratação seguido por decomposição em três etapas 238,16°C, 251,71°C e 305,89°C, **Figura 15b**. Os dados de TGA para as microesferas de quitosana impregnadas com corante sugerem menor estabilidade térmica do material impregnado quando comparado com os compostos puros.

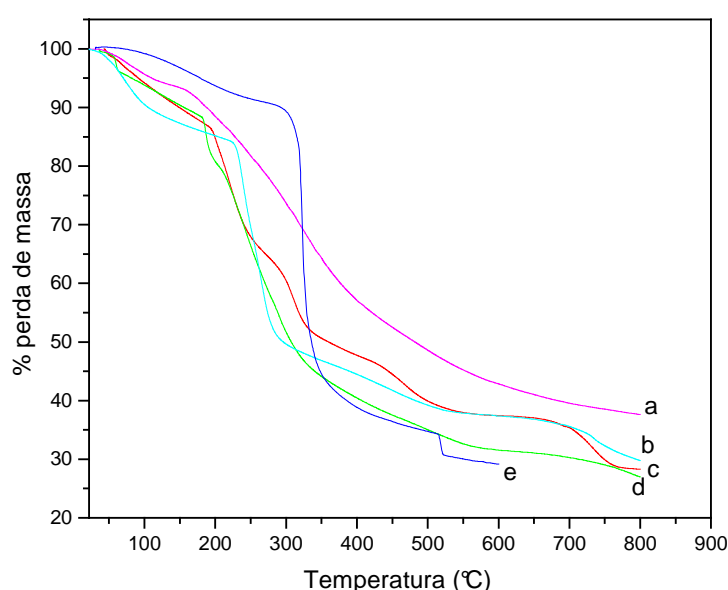


Figura 16 – Análise de TGA: a) corante, b) alginato de sódio, c) microesferas de quitosana/alginato, d) microesferas de quitosana/alginato impregnadas com corante e e) quitosana.

Os dados de TGA para as microesferas de quitosana/alginato impregnadas com corante são apresentadas na **Figura 16d**. Do mesmo modo, são apresentadas as curvas de TGA para as amostras de alginato de sódio, quitosana, quitosana/alginato sem corante e corante puro, para efeito de comparação dos resultados, sob aquecimento e nitrogênio, **Figura 16**.

A curva de TGA para a amostra de alginato puro, **Figura 16b** mostra uma etapa de desidratação em 74,01°C seguido por quatro etapas de decomposição em 239,32°C, 264,47°C, 450,40°C e 735,28°C. Segundo registros da literatura, os

produtos de decomposição em torno de 450,40°C e 735,28 são caracterizados como material carbonáceo (SOARES, et al., 2004).

Observa-se a partir da **Figura 16**, que as amostras de quitosana/ alginato sem corante sofrem um processo de desidratação em 66,25°C seguido por cinco etapas de decomposição 202,10°C, 221,99°C, 310,74°C , 466,54°C e 733,28°C, **Figura 16c**.

A curva de TGA para as amostras de quitosana/ alginato impregnadas com corante apresentaram uma etapa de desidratação em 60,87°C seguida somente por duas etapas de decomposição em 186,72°C e 239,9 2°C.

Os dados de TGA apresentados na **Figura 16** sugerem que as amostras de microesferas de quitosana/ alginato impregnadas com o corante apresentam menor estabilidade térmica que os produtos de partida

4.7 ANÁLISE DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC) PARA AS AMOSTRAS DE QUITOSANA E QUITOSANA/ ALGINATO

Quando um material sofre mudanças no seu estado físico, tais como fusão ou transição de uma forma cristalina para outra ou quando reage quimicamente, uma quantidade de calor está envolvida no processo.

Foram feitas análises de DSC para as microesferas de quitosana, **Figura 17** e para as microesferas de quitosana/ alginato, **Figura 18** impregnadas com o corante antocianina a fim de verificar as possíveis interações polímero – corante.

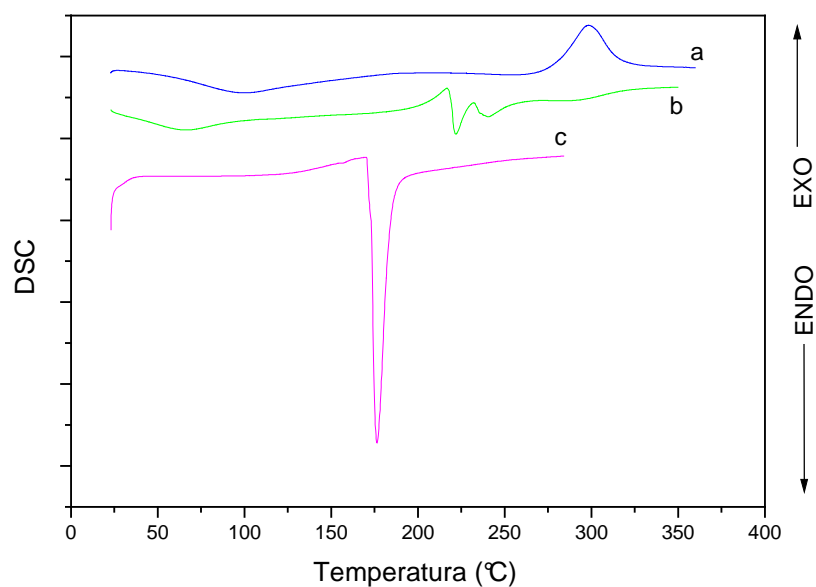


Figura 17 – Análise de DSC para as microesferas de quitosana: a) quitosana pura, b) microesferas de quitosana impregnadas com corante e c) corante.

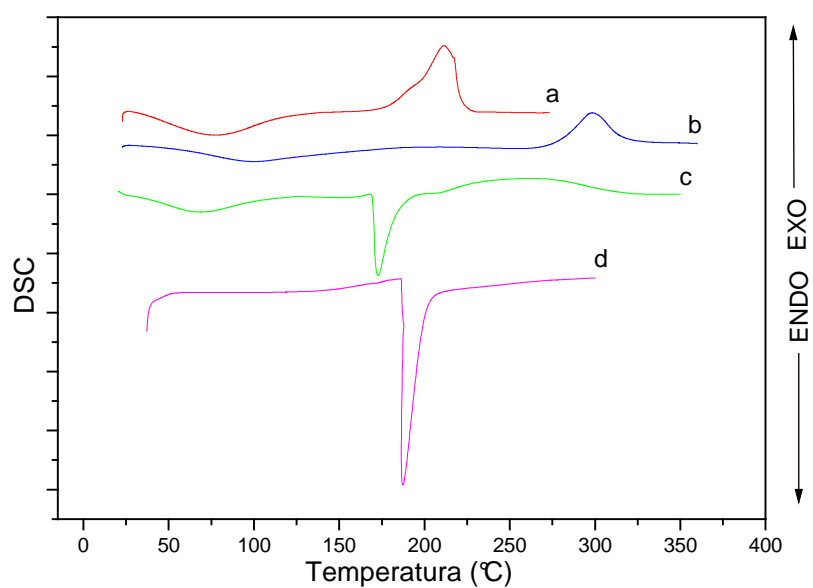


Figura 18 – Análise de DSC para as microesferas quitosana/ alginato: a) alginato de sódio, b) quitosana pura, c) microesferas de quitosana/ alginato impregnadas com corante e d) corante.

A **Figura 17**, mostra a transição detectada nos termogramas de quitosana pura, corante e microesferas de quitosana impregnadas com corante. Um pico exotérmico é observado para a quitosana em 299°C correspondente ao ponto de degradação da quitosana, **Figura 17a**. Para o corante, observa-se um pico endotérmico em 187,31°C, **Figura 17c**. O perfil do termograma das amostras de microesferas de quitosana impregnadas com corante sugere a existência de interação entre quitosana e corante com formação de um novo material, tendo em vista o aparecimento de dois picos endotérmicos em 240°C e 222°C e um pico exotérmico em 216,67°C, os quais não estão presentes nos termogramas do corante e da quitosana não impregnada.

A **Figura 18**, apresenta a curva de DSC para as amostras de microesferas de quitosana/ alginato impregnadas com o corante. Observa-se a presença de um pico exotérmico largo em 265,15°C e de um pico endotérmico em 172,85°C atribuído ao corante. O pico exotérmico largo pode ser atribuído aos polímeros, ocorrendo um deslocamento para temperaturas mais baixas. Estes dados sugerem a ocorrência de uma mistura física entre corante e matriz polimérica quitosana/ alginato, **Figura 18c**. O pico endotérmico na faixa de 60 - 100°C é devido a presença de umidade na amostra.

4.8 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE CORANTE IMPREGNADO

Através desta análise pode-se determinar a quantidade de corante impregnado através do método de adsorção por contato nas amostras de quitosana e quitosana/ alginato, como mostra a **Tabela 2**.

Tabela 2 – Determinação da quantidade de corante impregnado.

Microesferas Impregnadas	Quantidades de Corante Impregnado (mg%)
Quitosana	33,7
Quitosana/ Alginato	18,1

4.9 ESTUDOS DE CINÉTICOS

4.9.1 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO

A quantidade de corante antocianina liberado com o tempo (Mt) foi acompanhada pelo monitoramento do meio de liberação a 524 nm em um espectrofotômetro UV-Vis. A quantidade total de corante liberado (Mf) foi obtida após manter o mesmo algumas horas em solução.

O comportamento da curva de liberação das microesferas de quitosana impregnadas com corante representa um gráfico da fração de corante liberado em relação ao total liberado em função do tempo. Observa-se que a medida que o pH aumenta a liberação torna-se mais lenta, **Figura 19**.

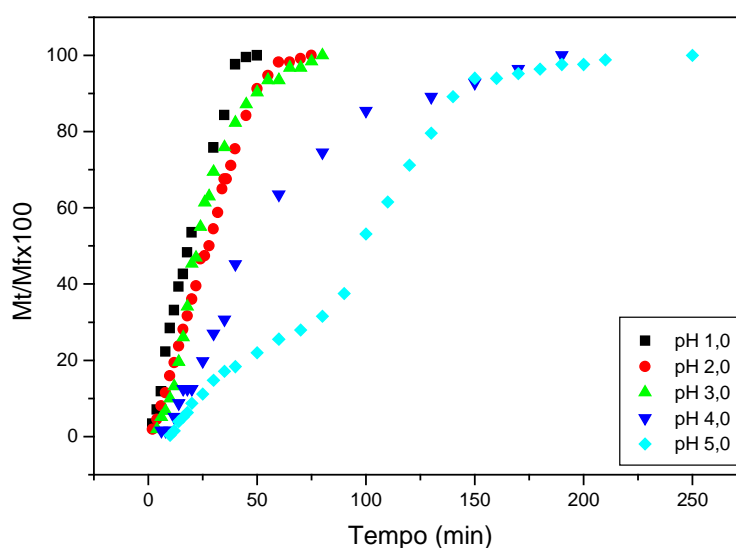


Figura 19 – Perfil da curva de liberação do corante a partir de microesferas de quitosana impregnadas em diferentes pHs.

Pode-se observar a partir da **Figura 19**, que todo corante é liberado a partir da matriz de quitosana, em menos de três horas não se levando em consideração o pH. Observa-se uma liberação mais rápida no pH 1,0 e uma liberação mais lenta a pH 5,0. A medida que o pH aumenta a quitosana sofre deprotonação e a

antocianina por sua vez adquirir a forma carbinol (neutra) diminuindo a interação entre as espécies.

A **Figura 20**, mostra o perfil de liberação do corante a partir de microesferas de quitosana/ alginato.

Pode-se observar uma velocidade de liberação mais rápida da antocianina para as amostra impregnadas de quitosana comparadas com as, de quitosana/ alginato, sendo o perfil da liberação para as microesferas de quitosana/ alginato mostrado na **Figura 20**.

O corante foi liberado a partir das microesferas de quitosana/ alginato em aproximadamente 4 horas. A liberação mais rápida ocorreu a pH 5,0, enquanto que a mais lenta ocorreu no pH 3,0.

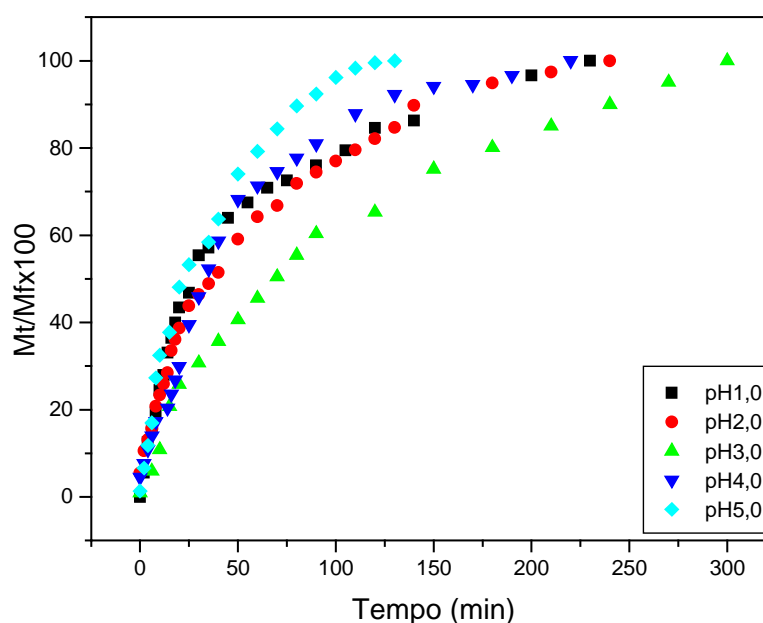


Figura 20 - Perfil da curva de liberação do corante a partir de microesferas de quitosana/ alginato impregnadas em diferentes pHs.

Em geral, pode-se observar a partir das **Figuras 19 e 20**, uma maior velocidade de liberação do corante a partir das microesferas de quitosana.

Após os estudos cinéticos de liberação com as microesferas impregnadas com quitosana observa-se a total dissolução das microesferas. Já as microesferas de quitosana/ alginato liberam totalmente o corante, porém permanecem em solução nos pHs 1,0 , 2,0 e 3,0.

A Tabela 3 apresenta o tempo necessário para a liberação de 50% do corante nos pH 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 a partir de microesferas de quitosana e quitosana/ alginato impregnadas com corante.

Tabela 3 – Liberação de 50% do corante a partir das microesferas de quitosana e quitosana/ alginato.

pH	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
50% de Liberação em Microesferas de Quitosana (min)	18	27	22	44	97
50% de Liberação em Microesferas de Quitosana/ Alginato (min)	25	36	67	33	20

As curvas de calibração utilizadas para a determinação das diferentes concentrações de corante e conseqüentemente da massa de corante liberada foram feitas mantendo-se as soluções tampão empregadas nos estudos de liberação e utilizando-se o $\lambda_{\text{máx}} = 524 \text{ nm}$. A absorbância foi plotada em função do tempo, obtendo-se as curvas de calibração para cada pH.

4.9.2 ESTABILIDADE DO CORANTE ANTOCIANINA EM FUNÇÃO DO pH

A **Figura 21** mostra o perfil das curvas cinéticas obtidas a partir dos estudos de degradação do corante antocianina. Estes resultados são importantes para efeito de comparação com os estudos cinéticos de liberação do corante impregnado.

A partir da massa de corante degradado, determinado através de uma curva de calibração do corante, o cálculo da porcentagem de corante degradado em cada pH foi feito a partir da equação:

$$\% \text{ corante degradado} = (M_t / M_f) \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

onde: M_t = massa de corante degradado no tempo t e M_f = massa total de corante degradado.

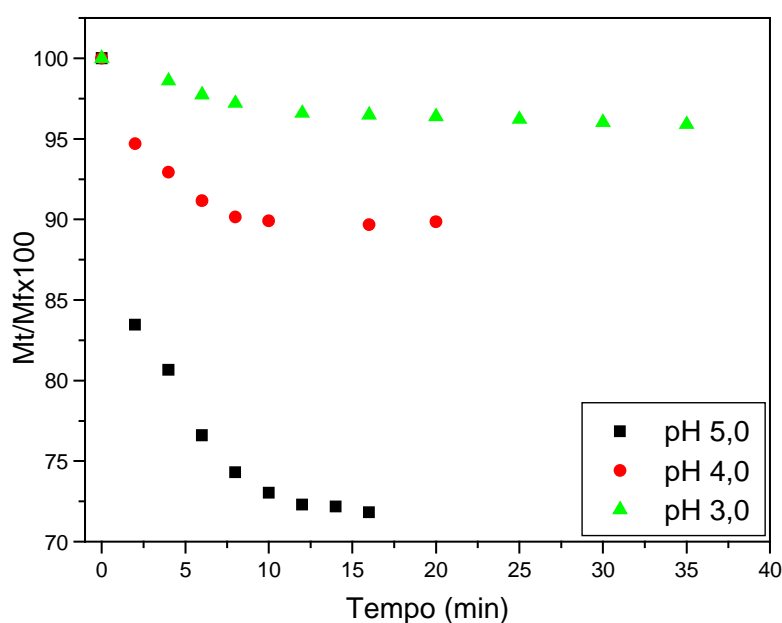


Figura 21 – Perfil da curva de degradação do corante em diferentes pHs.

Pode-se observar a partir da **Figura 21** que o corante antocianina é bastante instável nos pH 3,0, 4,0 e 5,0, verificando-se uma rápida degradação. Em pH 1,0 e 2,0 o corante é bem mais estável.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ❖ Recentemente, muita atenção tem sido dada ao pigmento antocianina, por se tratar de um corante natural de coloração atrativa, despertando o interesse em se propor novas tecnologias, que garantam uma maior estabilidade a estes pigmentos, de forma a aumentar a sua aplicação na indústria química.
- ❖ O uso de um encapsulante adequado pode proporcionar máxima proteção ao ingrediente ativo contra condições adversas como luz, pH, oxigênio, temperatura e ingredientes ativos.
- ❖ Neste trabalho, investigou-se a eficiência dos biopolímeros quitosana e alginato, como agentes encapsulantes de corantes naturais, a fim de promover maior proteção ao corante antocianina contra fatores como o pH.
- ❖ A microscopia eletrônica de varredura indicou que as microesferas apresentaram morfologias externas diferentes, sendo observado para as microesferas de quitosana impregnadas com corante a presença de fissuras e ausência de poros, enquanto as microesferas de quitosana/ alginato apresentaram-se rugosas e com fissuras. Todas as amostras apresentam boa esfericidade.
- ❖ A presença de fissuras nas microesferas pode comprometer a proteção oferecida pelo agente encapsulante ao ingrediente ativo.
- ❖ O espectro no infravermelho das amostras impregnadas com corante não apresenta mudanças significativas, quando comparado com o espectro no infravermelho das amostras puras.
- ❖ Os dados de análise térmica das amostras impregnadas com o corante revelam uma menor estabilidade térmica em relação aos biopolímeros.
- ❖ As análises de DSC sugerem a existência de uma interação química nas amostras de quitosana impregnadas e de interação física nas amostras de quitosana/ alginato impregnadas com o corante.
- ❖ Os estudos de liberação indicam uma maior velocidade de liberação do corante a partir das microesferas de quitosana. Para estas microesferas, a maior liberação ocorreu no pH 1,0 e a menor liberação no pH 5,0. Para as

microesferas de quitosana/ alginato a maior liberação ocorreu no pH 5,0 e a menor no pH 3,0.

- ❖ A partir dos estudos cinéticos pode-se verificar que os biopolímeros empregados neste trabalho ofereceram maior estabilidade ao corante, com relação ao pH.
- ❖ Entende-se que é crescente a busca de novas tecnologias que permitam abranger o maior número de produtos naturais, dentre eles os corantes naturais principalmente no setor alimentício, pois é cada vez maior a procura, por parte da sociedade, por uma vida mais saudável e de maior qualidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, K & KING, C. J., **Factor governing surface morphology of spray-dried amorphous substances**, Drying Technology, v. 3, n. 3, p. 321-348, 1985.

ANTUNES, L. M. G., ARAÚJO, M. C. P., **Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos**, Rev. Nutr., 13(2), p. 81-88, 2000.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**, Corantes Naturais, cap. 16, Viçosa: UFV, 1999.

BARRY, D. M.; **Journal Chemical Education**, v. 74, p. 1175, 1997.

BENITA, S., **Microencapsulation methods and industrial application**, New York: Marcel Dekker, Inc., 1996.

BROUILLARD, R., **Chemical structure of anthocyanin**. In: MARKAKIS, P., Anthocyanin as Food Colors. London: Academic Press, p. 1-40, 1982.

CAVALHEIRO, E. T. G., COUTO, A. B., RAMOS, L. A., **Aplicação de pigmentos de flores no ensino de química**. Química Nova, v. 21, n. 2, p. 221-227, 1998.

CHEN, R. H., TSAIH, M. L., LIN, W. C., **Effects of chain flexibility of chitosan molecules on the preparation, physical and release characteristics of the prepared capsule**, Carbohydrate polymers, n. 31, p. 141-148, 1996.

CURTRIGHT, R., RYNEARSON, J.A., MARKWELL, J. **Anthocyanins Model compounds for learning about more than pH**. Journal Chemical Education, v.73, n. 4, p.306-309, 1996.

DZIEZAK, J. D., **Microencapsulation and Encapsulated Ingredients**, Food Technology, Chicago, v.42, n.4, p. 136-151, 1988.

FRANCIS, F. J., MARKAKIS, P. C., CRC Critical Reviews in **Food Science and Nutrition**, v. 28, n. 4, p. 273-314, 1989.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Evaluation of certain food additives, Geneva, p. 1-37, 1974. (Technical Report Series, 557).

FURLAN, L., **Adsorção de corantes reativos e fotossensíveis por aminopolissacarídeos naturais**, 1997, Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química – UFSC – Florianópolis.

HARBONE, J. B., **The chromatographic identification of anthocyanin pigments**, Journal of Chromatography, 1, 1958 a, 473-488, 1967.

HARBONE, J. B., **Comparative Biochemistry of the Flavonoids**. New York: Academic Press. p. 1-36, 1967.

HEGENBART, S.; **Encapsulated ingredients keep problems covered**. Food Product Design, New York, v.3, n.1, p.28-34, 1993.

HENDRY, G. A. F., HOUGHTON, J. D., **Natural Food Colorants**, ed., Blackie and Son Ltd, London, cap. 2, 1992.

HUANG, R. Y. M., PAL, R., MOON, G. Y., **J. Membrane Sci**, 160, 101, 1999.

IVANISSEVICH, A., MASSARANI, L., **No mercado das cores**, Ciência Hoje, v.9, n. 53, 1989.

JACKMAN, R. L., YADA, R. Y. and TUNG, M. A., A review: separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative analysis. **J. Food Biochemistry**, v. 29, p. 279-308, 1987.

KADOKAWA, J., SAITOU, S., SHODA, S., **Preparation of alginate-polymethacrylate hybrid material by radical polymerization of cationic methacrylate monomer in the presence of sodium alginate**, Carbohydrate Polymers, 60, p. 253-258, 2005.

KEARSLEY, M. W., RODRIGUEZ, N., **The stability and use of natural colours in food: anthocyanin, beta-caroteno and riboflavin**, Food Technology, v. 16, p. 421-431, 1981.

KIMURA, I. Y., **Remoção de Corantes Reativos contendo grupos vinilsulfona e triazina por adsorção e coagulação/floculação com Quitosana**, 2001, Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química – UFSC – Florianópolis.

KING, A. H., **Encapsulation of food ingredients: a review of available technology, focusing hidrocolloids**. In: RISH, S. J., REINECCIUS, G. A., Encapsulation and controlled release of food ingredients. Washington, DC: 1995, p. 8-25.

KITTUR, F. S., THARANATHAN, R. N., **Chitin – The Undisputed Biomolecule of Great Potential**, Critical Review in Food Science and Nutrition, 43(1), 61-87, 2003.

KRAJEWSKA, B., **Application of chitin- and chitosan- based materials for enzyme immobilizations: a review**, Enzyme and Microbial Technology, v. 35, p. 126-139, 2004.

LEE, H. S., HONG, V., **Review: Chromatographic analysis of anthocyanins.** J. Chromatography, v. 624, p. 221-234, 1992.

MARKWELL, J., CURTRIGHT, R., RYNEARSON, J. A., **Anthocyanins – model de compounds for learning about more than pH.** Journal Chemical Education, v. 73, n. 4, 1996.

MATHUR, N. K., NARANG, K. C., **Versatile polyssacharides from marine animais,** Journal of Chemical Education, v. 67, n. 11, p. 938, nov 1990.

MAZZA, G.; BROUILLARD, R. **Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products.** Food Chem., v. 25, p. 207-225, 1987.

MEBANE, R. C.; RYBOLT, T. R.; **Journal Chemical Education,** v. 62, p. 285, 1985.

MUZZARELLI, R. A. A., **Natural chelating polymers,** Pergamon Press, Oxford, 1973.

NAKAMURA, K., NISHIMURA, Y., HATAKEYAMA, T., HATAKEYAMA, H., **Thermal properties of water insoluble alginate films containing di- and trivalent cations,** Thermochemica Acta, 267, p. 343-353, 1995.

NOTARA, M. D., SCOTCHFORD, C. A., GRANT, D. M., ROBERTS, G. A. F., **The characterization and the reply of the stack of derivatives chitosan and alginate mix the membranes with the different methods crosslinking,** European Cells and Materials, v. 7, p. 72, 2004.

POTHAKAMURY, U. R., BARBOSA – CANOVÁS, G. V., **Fundamental aspects of controlled release in foods,** Trends in food Sci & technology, 6, 1995.

RAYMOND, L., FREDRICK, G.M., MARCHESSAULT, R. H., **Degree of deacetylation of chitosan using conductimetric titration and solid state NMR**, Carbohydrate Research, v. 246, p. 331-336, 1993.

REINECCIUS, G. A., **Flavor encapsulation**, Food Ver. Int. New York, v. 5, n. 2, p. 147-176, 1989.

RISH, S. J., **Encapsulation: overview of uses and techniques**, In: RISH, S. J., REINECCIUS, G. A., Encapsulation and controlled release of food ingredients. Washington, DC: p. 8-25, 1995.

SANFORD, P. A., HUTCHINGS, G. P., **CHITOSAN – A natural cationic biopolimer comercial applications**, In: YALPINI, M., Industrial polysaccharides: genetic engineering structure / property relations and applications, p. 363-367, 1997.

SHAHIDI, F., HAN, X. Q., **Encapsulation of Food Ingredients**, Critical Review in Food Science and Nutrition, 33, 6, 501-547, 1995.

SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., **Fundamental of Analytical Chemistry**, 6^a ed., Forth Worth: Saunders College, 892 p., 1991.

SOARES, J. P., SANTOS, J. E., CHIERICE, G. O., CAVALHEIRO, E. T. G., **Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt**, Eclética Química, v. 29, n. 2, p. 57-63, 2004.

SPARKS, R. E., **Microencapsulation**. In: Kirk-Othmer. Encyclopedia of Chemical Technology, 3 ed. John Wiley and Sons, New York, v. 15, p. 470, 1981.

TAN, C. S.; KHOR, E.; TAN, T. K.; WONG, S. M., **The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination**. Talanta, v. 45, p. 713-719, 1998.

TIMBERLAKE, C. F.; BRIDLE, P. **The Flavonoids – Part I**; HARBORNE, J.B.; MABRY, T. J.; MABRY, H., eds.; Academic Press: New York, p. 215, 223, 1975.

WERNER, L. E., **Encapsulated food acids**, Cereal Foods World, St. Paul, v. 25, n. 3, p. 102-103, 1980.

WHORTON, C., REINECCIUS, G. A., **Evaluation of the mechanism associated with the release of encapsulation flavor materials from maltodextrin matrices**. In: RISH, S. J., REINECCIUS, G. A., Encapsulation and controlled release of food ingredients. Washington, DC: 1995, p. 143-160.

WHORTON, C., **Factors influencing volatile release from encapsulation matrices**. In: RISH, S. J., REINECCIUS, G. A., Encapsulation and controlled release of food ingredients. Washington, DC: 1995, p. 134-142.

WONG, W. S., **Química de los alimentos: Mecanismos e teoría**. Zaragoza: Acribia S.A., p. 164-215, 1995.

YEOM, C. K., LEE, K. H., **Appl. Polym. Sci**, 67, 209, 1998.